

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Irena Grahovac

UČINAK NALTREKSONA NA AKTIVACIJSKO STANJE BV-2 MIKROGLIJA STANICA

Specijalistički rad

Zagreb, 2019.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Irena Grahovac

Učinak naltreksona na aktivacijsko stanje BV-2 mikroglija stanica

Specijalistički rad

Zagreb, 2019.

PSS studij: Poslijediplomski specijalistički studij Klinička farmacija

Mentor rada: izv. prof. dr. sc. Lidija Bach-Rojecky

Specijalistički rad obranjen je dana 24. siječnja 2019. na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu, pred Povjerenstvom u sastavu:

1. doc. dr. sc. Petra Turčić

Sveučilište u Zagrebu

Farmaceutsko-biokemijski fakultet

2. izv. prof. dr. sc. Lidija Bach-Rojecky

Sveučilište u Zagrebu

Farmaceutsko-biokemijski fakultet

3. prof. dr. sc. Melita Šalković-Petrišić

Sveučilište u Zagrebu

Medicinski fakultet

Rad ima 46 listova.

Ovaj specijalistički rad prijavljen je na Sveučilištu u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu i izrađen pod stručnim vodstvom mentorice izv. prof. dr. sc. Lidije Bach-Rojecky te u suradnji s prof. dr. sc. Nataliom Kučić sa Zavoda za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci.

SAŽETAK

Cilj istraživanja

Polazeći od hipoteze da je aktivirajuće polarizacijsko stanje (M1/M2) mikroglija stanica odgovorno za ishod bolesti središnjeg živčanog sustava (SŽS) koji u svojoj patofiziološkoj osnovi imaju upalnu komponentu, cilj ovog rada bio je istražiti potencijalno modulatorno djelovanje opioidnog antagonista naltreksona na mikrogliju u in vitro uvjetima.

Specifični cilj rada bio je ispitati protuupalne učinke niskih doza naltreksona na promjenu imuno-metaboličkog profila BV-2 stanične linije mikroglije i njihovo prevođenje iz aktiviranog u mirujući imuno(neuro)protektivni fenotip.

Materijali i metode

Istraživanje je provedeno u in vitro uvjetima na modelu imortaliziranih BV-2 mikroglija stanica kultiviranih u standardnim uvjetima DMEM medija uz dodatak 10% FCS-a i bez dodatka FCS-a čime je postignut odgovarajući stanični fenotip kao polazište za testiranje lijeka. Promjene u morfologiji BV-2 mikroglija stanica praćene su pomoću svjetlosnog mikroskopa, a proteinski izražaj biljega M1 (iNOS) i M2 (CD206) aktivacijskog stanja metodom imunofluorescencije na staklu. Protočnom citometrijom praćen je površinski izražaj imunoloških molekula CD86, CD16/32, CD206, MHC I/II).

Metaboličke promjene u stanici procjenjene su na temelju mjerenja glikolitičke aktivnosti i potrošnje kisika Seahorse metodom.

Rezultati

Nakon standardnog uzgoja BV-2 mikroglija stanica u DMEM mediju uz dodatak 10% FCS-a (BV-2^{10%FCS}) zapažen je pretežito ameboidan oblik. Oduzimanjem FCS-a iz medija za uzgoj, BV-2 (BV-2^{0FCS}) stanice počinju pružati izdanke poprimajući razgranatu morfologiju koja predstavlja obilježje mirujućih mikroglija stanica. U navedenim uvjetima visoki izražaj iNOS-a obilježje je aktiviranih ameboidnih BV-2^{10%FCS} stanica dok izražaj istog opada u razgranatim mirujućim BV-2^{0FCS} stanicama uz upravo obrnuti obrazac izražaja molekule CD206 na temelju čega je iNOS^{poz} CD206^{neg} aktivirajući stanični fenotip M1 profila združen sa BV-2^{10%FCS}, a iNOS^{neg}CD206^{poz} mirujući stanični fenotip M2 profila sa BV-2^{0FCS}.

Pretpostavljeno protuupalno svojstvo naltreksona testirali smo na prethodno inducirajućem aktiviranom fenotipu BV-2^{10%FCS} (iNOS^{poz} CD206^{neg}) primjenjujući niske koncentracije u rasponu 10-50-100-250 μ M naltreksona. Koncentracija 100 μ M naltreksona pokazala se najučinkovitija u postizanju mirujućeg staničnog fenotipa (iNOS^{neg} CD206^{poz}). Istovremeno, izražaj površinskih imunoloških molekula CD86, CD16/32 nije se značajnije mijenjao što upućuje na slabo imunomodulacijsko svojstvo naltreksona spregnuto sa zbivanjima na staničnoj površini.

Polazeći od koncepta prema kojem se M1/M2 polarizacijski profil veže uz energetske i metaboličke status stanice, metaboličke promjene u stanici primjenom naltreksona pratili smo Seahorse metodom mjereći glikolitičku aktivnost i potrošnju kisika. Rezultati potvrđuju da su BV-2^{10%FCS} stanice metabolički aktivne dok su BV-2^{0FCS} mirujuće i energetske neaktivne. Koristeći FCS, LPS i IFN- γ kao induktore metaboličnog reprogramiranja, koji stanicu aktiviraju konfigurirajući je u odgovarajući metabolički fenotip, potvrdili smo LPS kao induktora aerobnog metabolizma, a IFN- γ kao čimbenika porasta anaerobnog metabolizma. Naltrekson

je smanjio energetske aktivnost stanice inducirane LPS-om te izrazito smanjio anaerobni metabolizam u stanicama aktiviranih s IFN- γ čime se naltrekson dodatno potvrđuje kao lijek koji djeluje na uspostavi ravnoteže staničnog metabolizma vodeći hiperaktivirane stanice u hipoenergetsko stanje.

Zaključci

Naltrekson u koncentraciji od 100 μ M dovodi do pretvorbe staničnog fenotipa BV-2 mikroglija stanica iz aktiviranog (iNOS^{poz} CD206^{neg}) u mirujuć (iNOS^{neg} CD206^{poz}) fenotip.

Naltrekson ne pokazuje imunomodulacijski učinak na aktivirane BV-2 mikroglija stanice budući da ne mijenja izražaj površinskih staničnih molekula (CD86, CD16/32, CD206, MHC molekula I i II razreda).

Naltrekson uspostavlja ravnotežu staničnog metabolizma dovodeći BV-2 mikroglija stanice iz hiperaktiviranog (inducirane s FCS, LPS, IFN- γ) u hipoenergetsko stanje.

Ključne riječi: BV-2 mikroglija stanice, naltrekson, M1/M2 fenotip

SUMMARY

Objectives

Based on the hypothesis that the activating polarization state (M1 / M2) of microglia is responsible for the outcome of the CNS diseases with an inflammatory component in the pathophysiological mechanism, we joined the concept of study the 'old' drugs confirmed within other indication to be elucidated as the modulators of microglial cells with an ability to convert them into immune (neuro) protective phenotype.

The specific aim of the work was to test the anti-inflammatory properties of low doses naltrexone to alter the immuno-metabolic profile of BV-2 microglia and their transition from activated into a resting state.

Materials and methods

The study was performed in in vitro conditions on the model of immortalized BV-2 microglia cells cultured in the standard DMEM media without or supplemented with 10% FCS to achieve the appropriate cell phenotype as an initial state for further experiments. Changes in morphology of BV-2 microglia cells were followed by the light microscopy and the protein expression of M1 (iNOS) and M2 (CD206) activation status by the immunofluorescence. The surface expression of immunological molecules (CD86, CD16 / 32, CD206, MHC I / II) was analyzed by flow cytometry.

Metabolic cell changes were evaluated by measuring the glycolytic activity and oxygen consumption by the Seahorse method.

Results

After standard cultivation of BV-2 microglial cells in the DMEM medium supplemented with 10% FCS (BV-2^{10%FCS}), the predominantly amoeboid form was observed. By subtracting FCS from the growing medium, BV-2 (BV-2^{0FCS}) cells started with branching showing a ramified morphology as a feature of the quiescent microglia. In these conditions, an increased expression of iNOS was observed in activated amoeboid BV-2^{10%FCS} cells, while a decreased expression was a feature of the ramified quiescent BV-2^{0FCS} cells with exactly the reverse expression pattern was shown in CD206 molecule expression so based on that iNOS^{pos}CD206^{neg} M1 activated cell phenotype was associated with BV-2^{10%FCS} and iNOS^{neg}CD206^{pos} M2 quiescent cell phenotype was associated with BV-2^{0FCS}.

Anti-inflammatory properties of naltrexone were tested on previously activated BV-2^{10%FCS} (iNOS^{pos} CD206^{neg}) phenotype by administrating the low effective doses of naltrexone in the concentration range of 10-50-100-250 µM. Naltrexone in a dose of 100 µM was the most effective inducing a resting cell phenotype (iNOS^{neg} CD206^{pos}). At the same time, the expression of surface immune molecules CD86, CD16/32 did not change significantly, suggesting a weak immunomodulatory property of naltrexone coupled to the effects on the cell surface.

Within the concept that M1/M2 cell profile is related to its energy and metabolic status, cell metabolic changes upon a naltrexone administration were monitored with Seahorse by

measuring glycolytic activity and oxygen consumption rate. The results confirm that the BV-2^{10%FCS} cells are metabolic active while the BV-2^{0FCS} are quiescent and energetically inactive. By using FCS, LPS and IFN- γ as a metabolic activators with the ability to configure cell in a corresponding metabolic phenotype, LPS has been confirmed as an aerobic inducer and IFN- γ as an anaerobic metabolic inducer. Naltrexone reduced LPS-induced energetic activity and significantly reduced anaerobic metabolism in IFN- γ -activated cells and thus naltrexone can be consider as a cell metabolic modifier to preserve a balance between hyper- and hypo-energetic states.

Conclusion

Naltrexone administration at 100 μ M concentration transformed the BV-2 microglial cell phenotype from the activated (iNOS^{pos} CD206^{neg}) into a resting (iNOS^{neg} CD206^{pos}) phenotype.

Naltrexone does not immunomodulate the immune profile of BV-2 microglia cells without effecting the expression of cell surface immune molecules (CD86, CD16/32, CD206, MHC molecules I and II).

Naltrexone establishes the metabolic balance of BV-2 microglia cells shifted them from hyperactivated (induced by FCS, LPS, IFN- γ) into hypoenergetic state.

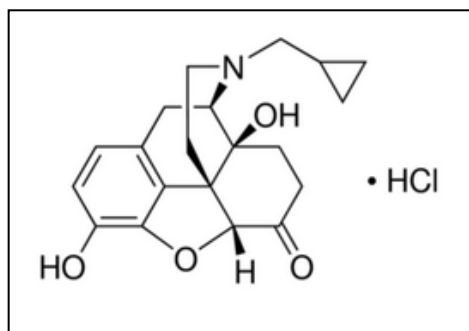
Key words: BV-2 microglia, naltrexon, M1/M2 phenotype

SADRŽAJ

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA	1
1.1. Značajke naltreksona kao opioidnog antagonista.....	1
1.2. Značajke naltreksona kao protuupalnog lijeka.....	2
1.3. Značaj mikroglija stanica kao imunoloških stanica središnjeg živčanog sustava.....	4
1.3.1. Mikroglija stanice u fiziološkim i patološkim uvjetima	6
1.3.2. Morfološki oblici i fenotipska obilježja mikroglija stanica	9
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	13
3. MATERIJALI I METODE	14
3.1. Materijali.....	14
3.1.1. Kemikalije.....	14
3.1.2. Mediji i puferi.....	15
3.1.3. Laboratorijsko posuđe.....	15
3.1.4. Protutijela.....	15
3.2. Metode.....	16
3.2.1. Stanična linija BV-2 mikroglija kao model za istraživanje	16
3.2.2. Svjetlosna mikroskopija	17
3.2.3. Imunofluorescencija na staklu (in situ)	17
3.2.4. Protočna citometrija (FACS analiza)	18
3.2.5. Metabolički esej (Seahorse).....	19
4. REZULTATI.....	20
4.1. Uspostava modela stanične diferencijacije te karakterizacija staničnog fenotipa pod utjecajem naltreksona	20
4.2. Imunomodulacijska svojstva naltreksona	23
4.3. Metabolički učinak naltreksona	24
5. RASPRAVA	27
6. ZAKLJUČCI	30
7. LITERATURA	31
8. ŽIVOTOPIS	35

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

1.1. Značajke naltreksona kao opioidnog antagonista



Slika 1. Kemijska struktura naltrekson hidroklorida (slika preuzeta sa Sigma-Aldrich⁴⁸).

Naltrekson je sintetiziran 1963. godine i primarno kategoriziran kao aktivni, kompetitivni antagonist opioidnih receptora¹.

Strukturalno i funkcionalno sličan je opioidnom antagonistu naloksonu (Slika 1), no za razliku od njega ima veću oralnu bioraspoloživost². Naltrekson hidroklorid odobren je od FDA 1984. godine za liječenje opioidne ovisnosti.

U dozi od 50 mg koristi se kao dodatna terapija uz psihološko savjetovanje u sklopu sveobuhvatnog programa liječenja bolesnika ovisnih o opioidima nakon detoksifikacije. Naltrekson djeluje kao stereospecifični kompetitivni antagonist opioidnih receptora (μ , κ i δ) te blokira pristup egzogeno primjenjenim opioidima.

U istoj dozi koristi se kao dodatna terapija uz psihološko savjetovanje u sklopu sveobuhvatnog programa liječenja osoba ovisnih o alkoholu kao potpora pri održavanju apstinencije.

Mehanizam djelovanja naltreksona u alkoholizmu nije potpuno razjašnjen; međutim, pretpostavlja se da u tome najvažniju ulogu ima interakcija s endogenim opioidnim i GABA inhibicijskim sustavom. Pretpostavlja se da se konzumiranje alkohola u ljudi pojačava zbog alkoholom inducirane stimulacije endogenog opioidnog sustava³.

Naltrekson u dozi od 8 mg u kombinaciji s 90 mg bupropiona se koristi za kontrolu tjelesne težine u odraslih osoba.

Točni neurokemijski učinci kombinacije naltreksona i bupropiona na smanjenje apetita nisu u potpunosti razjašnjeni. Oba lijeka utječu na centar za regulaciju apetita i to modulacijom opioidnog i dopaminergičnog sustava i to u arkuatnoj jezgri hipotalamusa i centrima nagrade (nukleus akimbens i ventralno tegmentalno područje)³.

Opioidni receptori pripadaju skupini receptora spregnutih s G-proteinima. Nalaze se presinaptički i postsinaptički i djeluju na dva načina: presinaptički zatvaraju kalcijeve kanale ovisne o naponu i smanjuju otpuštanje neurotransmitora (npr. glutamata, acetilkolina), a postsinaptički otvaranjem kalijevih kanala hiperpolariziraju neurone⁴.

Različito su distribuirani u središnjem živčanom sustavu i imaju različite učinke. Učinak preko μ receptora jest supraspinalna i spinalna analgezija, sedacija, depresija disanja, tjelesna ovisnost, smanjen gastrointestinalni motilitet, modulacija otpuštanja hormona i neurotransmitera. Putem δ receptora dolazi do supraspinalne i spinalne analgezije i modulacije otpuštanja hormona i neurotransmitora, dok je učinak κ receptora supraspinalna i spinalna analgezija te smanjeni gastrointestinalni motilitet².

1.2. Značajke naltreksona kao protuupalnog lijeka

U novije vrijeme predstavljen je koncept korištenja niskih doza naltreksona (NDN) kao novog protuupalnog lijeka u liječenju kronične neuropatske boli i ostalih stanja koje u svojoj patofiziološkoj osnovi sadrže upalnu komponentu; Crohnova bolest, multipla skleroza, fibromialgija⁵.

Pod pojmom NDN smatra se otprilike 1/10 uobičajene doze za liječenje ovisnosti što je prema većini objavljenih radova dnevna doza od 4,5 mg⁶⁻⁸.

Terapijski pristup NDN posebice dobiva na značaju u svjetlu novih spoznaja o suzbijanju upalne komponente djelovanjem na mikroglija stanice u SŽS-u. U tom smislu NDN jedan je od prvih predstavljenih modulatora glija stanica⁵. Pored navedenog, naltrekson pripada skupini aktivnih centralnih imunomodulatora što mu daje prednost nad konvencionalnim protuupalnim lijekovima koji slabije prolaze krvno-moždanu barijeru.

Za razumijevanje kliničke primjene NDN važno je napomenuti višestruki fiziološki mehanizam djelovanja naltreksona. Pored njegovog antagonističkog djelovanja na opioidne receptore istovremeno pokazuje antagonistički učinak i na ne-opioidne receptore iz porodice TLR, posebice Toll-like receptor 4 (TLR4) koji su u velikoj mjeri izraženi na makrofazima i mikroglija stanicama⁹.

Mnoge studije sve veću važnost pridaju dvostrukoj komunikaciji između neurona i imunokompetentnih stanica prisutnih u SŽS-u uključujući glija stanice (mikroglija, astrocite, oligodendrocite), endotelne stanice, perivaskularne makrofage i infiltrirajuće T- limfocite. Ove stanice su aktivirane posredstvom TLR-a kao odgovor na DAMP (eng., *danger-associated molecular patterns*) i PAMP (engl., *pathogen-associated molecular patterns*) signale¹⁰⁻¹².

Kao odgovor na te stimulirajuće signale stvaraju se subpopulacije imunih stanica s protuupalnim fenotipom.

Njihova aktivacija rezultira kaskadnim oslobađanjem proupalnih čimbenika (citokini, supstancija P, dušikov oksid, reaktivni kisikovi radikali, ekscitacijske aminokiseline) koji dovode do neurotoksičnosti kao osnovnog patofiziološkog mehanizma upale u SŽS¹³.

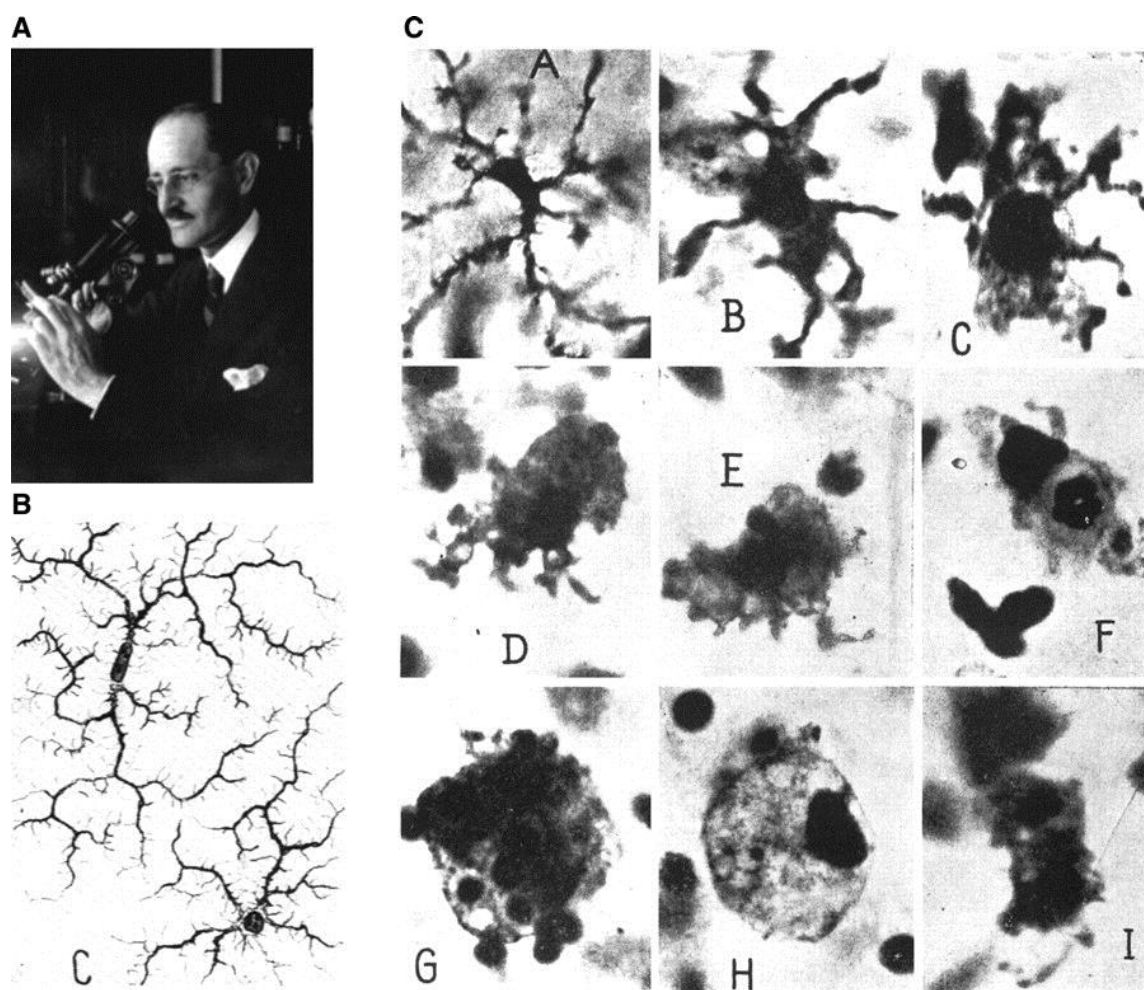
Iako je većina radova bazirana na djelovanju naltreksona putem TLR-4 na mikroglija stanicama, mnogi dobiveni podaci ne uklapaju se u tzv. TLR-4 hipotezu te se stoga nameće potreba za otkrivanjem novih posredničkih receptora i molekula u okviru njegove farmakološke aktivnosti.

1.3. Značaj mikroglija stanica kao imunoloških stanica središnjeg živčanog sustava

Mikroglija stanice predstavljaju prirođeni imunološki sustav u SŽS-u. Prisutne su u svim regijama mozga, leđnoj moždini te čak i u mrežnici. Dugi niz godina su smatrane jednostavnim makrofagima mozga, no kako saznanja o njima rastu, tako je i sve jasnija činjenica da mikroglija stanice posjeduju čitav niz funkcija koje bitno utječu na rad mozga. Primarne funkcije koje se pripisuju ovim stanicama su održavanje homeostaze i nadzor nad strukturalnim i funkcijskim integritetom SŽS-a^{14, 15}. Iznimna je njihova sposobnost brze reakcije i prilagodbe na razne podražaje poput ishemije i infekcije i stanja združenih s kliničkim entitetima poput Alzheimerove bolesti, shizofrenije i mnogih drugih iz čega proizlazi veliki interes i značaj za istraživanje¹⁶⁻¹⁸.

Mikroglija stanice po prvi puta opisuje Franz Nissl davne 1880. godine, no „ocem mikroglije“ smatra se Pio del Rio-Hortega, koji je 1932. godine u vizionarskom radu opisao primarne

funkcije ovih stanica (Slika 2). Hortegin rad rezultira postulatom da mikroglija ulazi u mozak tijekom ranog razvoja pri čemu opsežno opisuje morfologiju mikroglija stanica i zaključuje o uskoj sprezi stanične morfologije i funkcije. Kao glavne morfološke značajke navodi ameboidni i razgranati oblik ovih stanica te iznosi niz zapažanja o rasprostranjenosti mikroglije uvodeći pojam „teritorijalne“ raspodjele u SŽS-u. Navedena zapažanja važeća su i danas što nas vodi do zaključka kako suvremena istraživanja o mikroglija stanicama počivaju na temeljima koje je postavio Hortega¹⁹.



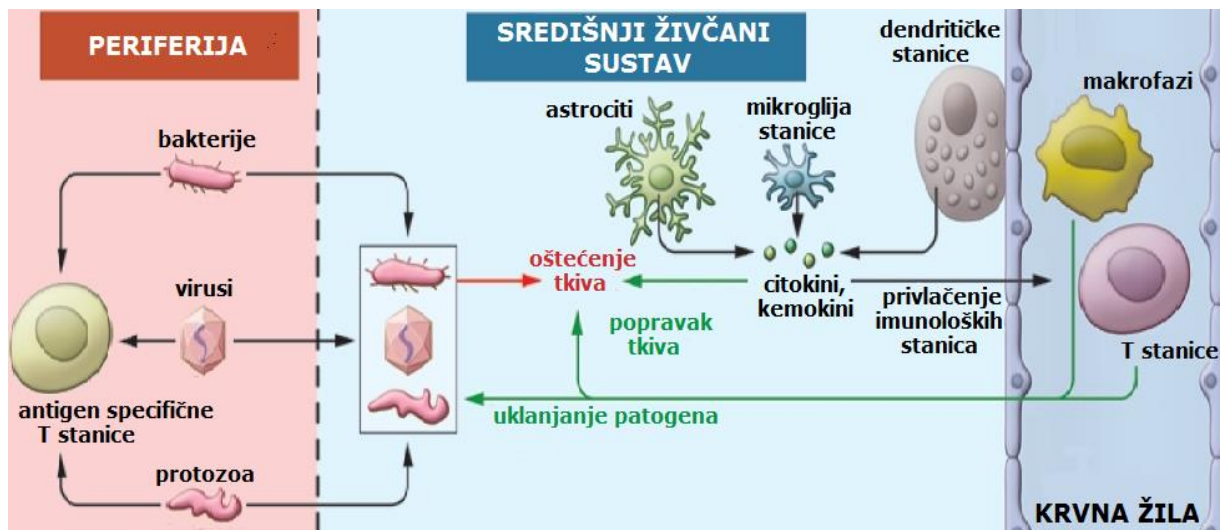
Slika 2. Pio del Rio-Hortega i mikroglija stanice. Mikroglija stanice koje je opisao Pio del Rio-Hortega. A: Pio del Rio-Hortega (1882-1945). B: Slika razgranate morfologije mikroglije koju je nacrtao Hortega. C: promjena morfologije mikroglije tijekom fagocitoze (od razgranate preko bipolarne do ameboidne). *Slika preuzeta iz Kettenmann i sur., 2011¹⁴.*

Zbog nemogućnosti izolacije stanica iz SŽ-a, uslijedio je izvjesni period zaborava na mikroglija stanice i tek s 1986. godinom otvara se mogućnost izolacije većeg broja²⁰, a daljnjim razvojem istraživačkih tehnika i specifičnih biljega dolazimo do suvremenih istraživanja mikroglija stanica, te svakodnevno svjedočimo novim spoznajama o funkciji ovih stanica.

1.3.1. Mikroglija stanice u fiziološkim i patološkim uvjetima

Mikroglija stanica su mezenhimalnog podrijetla te migriraju iz žumanjčane vreće tijekom ranog razvoja SŽS-a, prije završetka formacije krvno-moždane barijere te imaju značajnu ulogu u njegovom razvoju^{21,22}. Ključne su za proliferaciju i diferencijaciju neurona te za njihov raspored i umrežavanje. Mikroglija stanice posjeduju čitav niz receptora, od kojih su od posebnog značaja neurotransmitorski receptori koji omogućuju praćenje sinaptičke aktivnost te receptori za razne metabolite, kojima se može indirektno pratiti aktivnost susjednih neurona¹⁴. Te mogućnosti su iznimno bitne za provedbu praćenja primarne funkcije mikroglija stanica u smislu nadzornih stanica SŽS-a. Jedan od mehanizama regulacije aktivnosti neurona je remodeliranje sinapsi, odnosno fagocitoza nepotrebnih sinapsa (engl. *stripping*) te poticanje sinaptogeneze putem čimbenika rasta, čime mikroglija zauzima značajnu ulogu u plastičnosti mozga²³. Također, važna funkcija mikroglije je i fagocitoza staničnog debrisa i apoptotičnih stanica u SŽS-u, koja je poznata još od doba Hortege. Nedavno je otkriveno da mikroglija ima sposobnost i fagocitoze živih, ali stresiranih neurona, što može biti od iznimnog značaja u proučavanju patofiziološke funkcije mikroglije, no svakako je bitno i za održavanje homeostaze²⁴.

Mirujuća mikroglija je u stalnom kontaktu sa svim stanicama SŽS-a, tako da osim s neuronima, komunicira i s ostalim glija stanicama. U neurofiziologiji je poznat pojam *tripartitne sinapse*, odnosno komunikacije pre/postsinaptičkog neurona i astrocита, kojima se pridružuje i mikroglija pa stoga, možemo govoriti o *tetrapartitnoj sinapsi*, kao temeljem održavanja homeostaze. Stalnim nadzorom unutar tetrapartitne sinapse, mikroglija dovodi do brzog uočavanja prekida homeostaze te pokretanja prirođenog imunološkog odgovora²⁵.



Slika 3. Shematski prikaz imunosne reakcije u mozgu te uloga mikroglije u upalnom odgovoru. Prodorom patogena u mozak mikroglija stanice aktiviraju se izravno ili putem faktora koje luče astrociti. U takvim uvjetima one počinju lučiti upalne medijatore čiji je cilj uklanjanje patogena te privlačenje imunoloških stanica iz krvi. Kako reakcija napreduje počinju se lučiti i protuupalni citokini koji potiču popravak oštećenja tkiva koje nastaje kao posljedica upale. Međutim, u nekim slučajevima aktivacija se ne prekida i time upala postaje kronična *Prilagođeno prema Ransohoff i Brown, 2012*⁴⁹.

Mikroglija ima sposobnost brze preobrazbe morfologije nakon prepoznavanja patoloških poticaja, mijenjajući potom i fenotipska obilježja. Poticaje možemo podijeliti u već ranije dvije osnovne grupe: PAMP i DAMP. Termin PAMP se odnosi na brojna egzogena strukturna obilježja glikoproteina, lipopeptida, glikolipida, RNA i DNA bakterija, virusa, gljiva i protozoa

koje predstavljaju transformacijski signal i uzrokuju promjenu mikroglije u ameboidni oblik sa fagocitnim svojstvima. Endogeni poticaji se nazivaju DAMP signalima, te se javljaju u raznim bolestima koje nemaju egzogeni uzrok, no svejedno dovode do transformacije mikroglije i uzrokuju sterilnu upalu. DAMP koji su dosad otkriveni uključuju *high mobility group box protein* (HMGB) 1, čitav niz proteina toplinskog šoka (engl., *heat shock protein*, hsp), fibronektin, lipoprotein A, S100A8, S100A9, serumski amiloid i amiloid β (A β) te fetuin A²⁶⁻²⁹. Upravo zbog navedene karakteristike prepoznavanja prekida homeostaze, možemo reći da nema bolesti u SŽS-u u kojem mikroglija nema važeću ulogu. Većina PAMP i DAMP signala djeluju putem receptora za prepoznavanje obrazaca (engl. *pattern recognition receptor*, PRR) karakterističnih za prirođenu imunost čijom aktivacijom se pokreće signalna kaskada koja uključuje NF κ B (engl., *nuclear factor kappa B*) i MAPK (engl., *mitogen-activated protein kinase*) aktivnost koja ima za cilj transformaciju mikroglije u proupalni oblik. Proupalni fenotip se u proteklih nekoliko godina naziva i M1 polarizacijski fenotip. Funkcija proupalne mikroglije nije samo fagocitoza, već i lučenje proupalnih citokina i regrutacija stanica periferne imunosti koje dovodi do podržavanja upale³⁰ (Slika 3).

U nekim slučajevima može doći do pretjerane transformacije mikroglije i proupalne reakcije koja začaranim krugom potiče samu sebe, čime dovodi do neurotoksičnih učinaka. Kao glavni primjer toga su neurodegenerativne bolesti poput Alzheimerove ili Parkinsonove bolesti. Starenjem mozga stare i glija stanice, koje u starosnoj dobi imaju manje izdanaka unutar svog razgranatog stanja nego u mladosti. Smatra se da u takvim uvjetima mikroglija ima veće predispozicije za proupalnim fenotipom, stoga ne čudi njihova uloga u neurotoksičnosti koja se javlja u spomenutim neurodegenerativnim bolestima³⁰. Postoje i dokazi kronične upale koja se javlja u psihijatrijskim bolestima kao što su shizofrenija i bipolarni poremećaj, kao

reakcije mikroglija stanica na pretjeranu aktivnost neurona³¹. Svakako treba naglasiti da je štetnost mikroglije u tim bolestima samo pretpostavljena, a ne dokazana, te postoje i indikacije da je neurotoksičnost u ovim slučajevima korisna jer dovodi do propadanja nepravilno strukturiranih i raspoređenih neurona i sinapsi³².

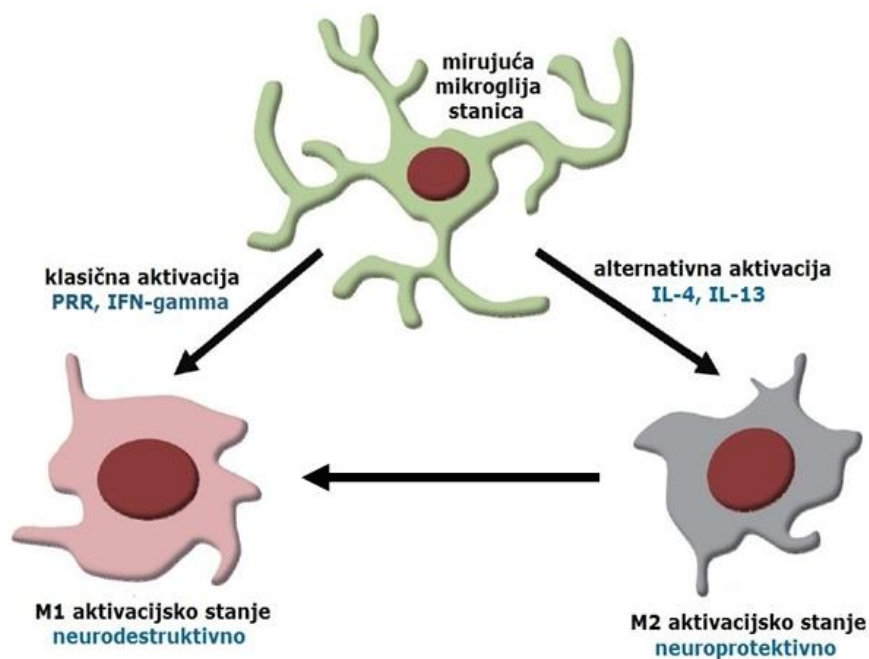
S obzirom na raznolikost reakcija mikroglija na patološke poticaje, može se zaključiti da mikroglija stanice u svom prvotnom odgovoru potpomažu reorganizaciji tkiva i da u većini slučajeva potpomažu i regeneraciji, osim kad dolazi do pretjerane proupalne transformacije i nedostatka protuupalnih čimbenika kao protutežnog mehanizma u održanju homeostaze.

1.3.2. Morfološki oblici i fenotipska obilježja mikroglija stanica

U zdravom mozgu mirujuće mikroglija stanice imaju razgranatu morfologiju. Međutim, neuropatološka stanja poput patogena, hipoksije ili ozljede uzrokuju njihovu aktivaciju koja je prije svega uočljiva kroz promjenu njihove morfologije. Tri su osnovna morfološka oblika koja se susreću u *in-vitro* uvjetima: razgranati (engl. *ramified*), bipolarni (engl. *rod-shaped*) i ameboidni (Slika 2).

Iako se u *in-vitro* uvjetima raznim stimulacijama stanice mogu transformirati u željeni oblik, u *in-vivo* uvjetima se rijetko može naći jedinstvena populacija te najčešće perzistira kombinacija oblika koje se neprestano mijenjaju u dinamičnom međusobnom odnosu te spram ostalih stanica SŽ-a. Može se okvirno reći da spomenuti morfološki oblici odgovaraju određenim aktivacijskim stanjima pri čemu razgranati oblik, prema uvriježenoj klasifikaciji za makrofage/mikroglija stanice, pripada M2 aktivacijskom stanju, a ameboidni M1 stanju, dok se bipolarni smatra prijelaznim oblikom između M1 i M2. Naravno, u stvarnim uvjetima je

rijetka tako jasna dihotomija te su puno češće prisutne kombinacije aktivacijskih stanja ovisno o potrebama organizma³³ (Slika 4).



Slika 4: Morfologija mirujućih i aktiviranih mikroglija stanica te njihova transformacija / polarizacija unutar aktivacijskih stanja. Ovisno o njihovom mikrookolišu, mikroglija stanice poprimaju jedno od dva aktivacijska stanja tipična za makrofage. M1 fenotip obično je izravna reakcija na patološki učinak, prvenstveno patogene, i zaslužan je za poticanje upale. Kako imunološka reakcija napreduje, oslobađaju se protuupalni citokini koji usmjeravaju mirujuće mikroglije prema M2 aktivacijskom stanju, čija je uloga popravak nastalih oštećenja. Češća je mogućnost prijelaza M2 mikroglija stanica/makrofaga u M1 aktivacijsko stanje, dok je obrnuti slučaj veoma rijedak. *Preuzeto i prilagođeno prema Huang i Feng, 2013⁵⁰.*

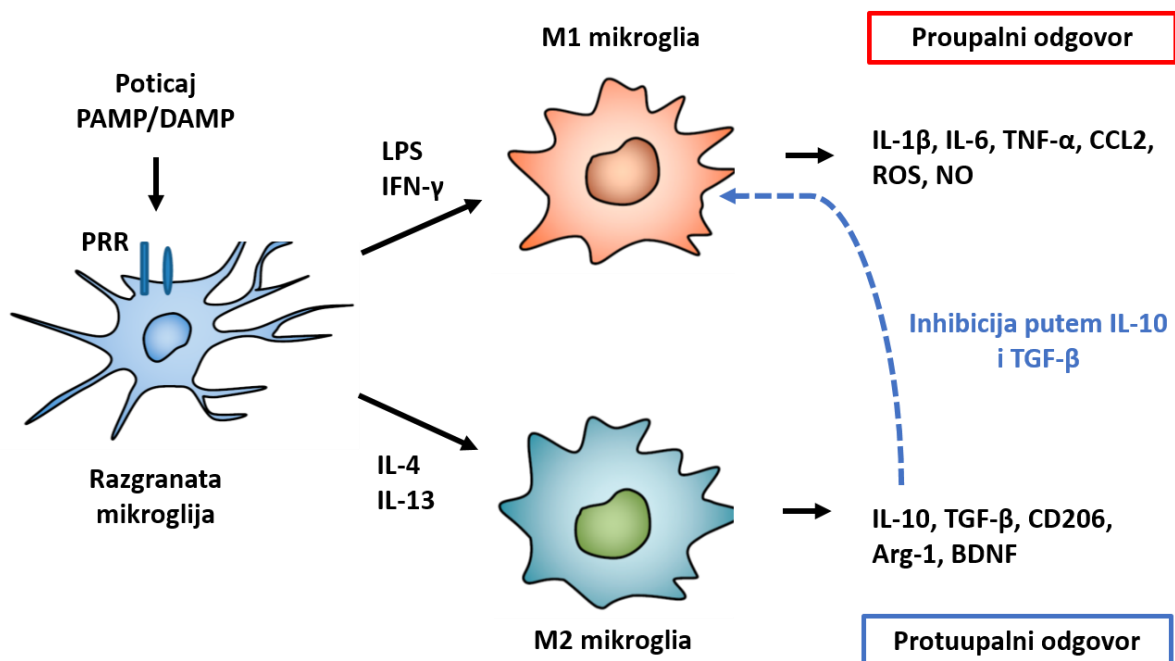
Transformacija mikroglije u M1 stanje odvija se tzv. „klasičnim“ putem, pod utjecajem raznih poticajnih čimbenika kao što su lipopolisaharidi (LPS) i interferon-gama (IFN- γ). M1 stanje je proupalno, pa shodno tome je povezano i s lučenjem proupalnih citokina kao što su faktor nekroze tumora- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), superoksidi, dušikov oksid (NO), reaktivne

kisikove jedinke (ROS) i proteaze^{34, 35}. Stanje je praćeno i povećanjem izražaja površinskih staničnih molekula koje pripadaju sustavu tkivne podudarnosti (engl. *major histocompatibility complex*, MHC molekulule I i II razreda) i sudjeluju u prezentiranju antigena imunološkim stanicama, što je značajka širenja upale i transformacije drugih stanica u proupalna stanja. Na ovaj način, daljnja regrutacija perifernih monocita, ali i lokalne mikroglije odvija se pomoću kemokina, od kojih je u mikrogliji najviše istražen monocitni kemotaktički protein (engl. *monocyte chemotactic protein*, MCP-1)³⁶. Navedene značajke i sposobnosti M1 mikroglija vezane su za njihovu primarnu funkciju čime one postaju prva linija obrane protiv ozljede i infekcije brzim uništenjem patogena i stvaranja proupalnog mikrookoliša. Kao što je ranije spomenuto, od iznimne je važnosti da dominacija ovog aktivacijskog stanja ima ograničeno trajanje, odnosno da prestaje nakon otklanjanja patogena. Preduga dominacija M1 stanja može dovesti do kroničnih upala koje mogu poticati razvoj prijašnje spomenutih bolesti ili patoloških stanja.

M2 aktivacijsko stanje može nastati na dva načina: „alternativnim“ putem ili „deaktivacijom“ M1 mikroglija stanica. Pojam „alternativnog“ puta se odnosi na transformaciju mikroglija uzrokovanu interleukinima -4 i -13 (IL-4 i IL-13), dok se „deaktivacija“ odnosi na protuupalni mehanizam inhibicije M1 aktivacijskog stanja putem citokina interleukin-10 (IL-10) i transformirajući faktor rasta- β (TGF- β). M2 aktivacijsko stanje nastaje istovremeno kao reakcija na proupalno M1 aktivacijsko stanje, kako bi se nakon uništenja patogena ili štetnih čimbenika odmah potakla reparacija tkiva i homeostaza. Glavni citokini koje mikroglija luči za prekid upale su IL-4, IL-10, IL-13 i TGF- β , koji imaju sposobnost i pretvorbe proupalne mikroglije u M2 stanje^{37, 38}. Reparacija tkiva i rast se potiče posredstvom izražaja i aktivnosti molekula poput CD206, moždanog neurotrofnog čimbenika (engl. *brain derived neurotrophic*

factor, BDNF) i arginaze-1 (Arg-1)³⁵ (Slika 5). Valja naglasiti da i prevelika aktivacija M2 stanja može poticati nastajanje kroničnih bolesti te se pokazalo da M2 stanje prevladava kod depresije³⁹.

Dinamički proces tijekom upale i interakciju M1 i M2 aktivacijskih stanja možemo usporediti s konceptom „yina i yanga“. Oba aktivacijska stanja su krucijalna i nezaobilazna za rezoluciju patoloških stanja i reparaciju tkiva, no ključna je i ravnoteža, jer povećana aktivacija bilo kojeg može uzrokovati nastanak bolesti.



Slika 5. M1 i M2 transformacija mikroglije i njihova imunoregulatorna funkcija. Mirujuće mikroglije su stimulirane PAMP i DAMP-ima putem PRR receptora. U prisutstvu LPS i IFN γ mikroglija stanice transformiraju u M1 stanje i otpuštaju proupalne citokine koje uključuju IL-1 β , IL-6, TNF- α , CCL2, ROS, and NO. U suprotnosti s time, IL-4 i IL-13 induciraju „alternativnu“ transformaciju mikroglije u M2 stanje koje inhibira M1 stanje putem protupalnih citokina IL-10 i TGF- β te luče i faktore koje promoviraju obnovu homeostaze poput Arg-1, BDNF i CD206. *Prilagođeno prema Nakagawa i Chiba, 2014.*⁴⁰

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Polazeći od hipoteze da je polarizacijsko stanje (M1 vs M2) mikroglija stanica odgovorno za ishod bolesti SŽS-a koji u svojoj patofiziološkoj osnovi imaju upalnu komponentu, nameće se potreba istražiti lijekove kao moguće modulatore koji će mikroglija stanice kontrolirano prevesti u imuno(neuro)protektivni fenotip.

Specifični je cilj ovog specijalističkog rada utvrditi promjenu imunosnog profila BV-2 mikroglija stanica i njihove metaboličke aktivnosti koja je u sprezi s navedenim staničnim fenotipom u uvjetima primjene niskih doza naltreksona.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJALI

Za potrebe ovog istraživanja korištene su kemikalije i materijali od različitih proizvođača, a uvjeti su prilagođeni prema protokolima dostupnim u laboratoriju Zavoda za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci, gdje je istraživanje provedeno.

3.1.1. Kemikalije

DMEM medij, Pan Biotech, Aidenbach, Njemačka

Fetal Calf Serum, Gibco, Grand Island, New York, SAD

Interferon gama (IFN- γ), Genentech, San Francisco, USA

Kit za Seahorse 'Cell Energy Phenotype Test Kit', Agilent, Santa Clara, CA, USA

L-glutamin, Gibco, Grand Island, New York, SAD

Lipopolisaharid (LPS) iz E. Coli , L-4005, Sigma, Njemačka

Moviol, Sigma, Taufkirchen, Njemačka

Naltrexone hydrochloride, N3136, Sigma-Aldrich, Njemačka

Paraformaldehid, Sigma, Taufkirchen, Njemačka

Penicilin streptomycin, Pan Biotech, Aidenbach, Njemačka

Tripansko modriilo, Sigma, Taufkirchen, Njemačka

Trypsin, Serva, Heidelberg, Njemačka

Triton X-100, Sigma, Taufkirchen, Njemačka

3.1.2. Mediji i puferi

10%-tni DMEM medij uz dodatak *Fetal Calf Serum* (FCS) 10% (v/v), Penicilin streptomycin 1% (v/v), L-glutamin 1% (v/v)

FACS medij

Fetal Calf Serum (FCS) 2% (v/v), Sheat fluid 98% (v/v) (Natrijev klorid (NaCl) 34,7 M, Kalijev dihidrogenfosfat (KH_2PO_4) 480 mM, Natrijev hidrogenfosfat (Na_2HPO_4) 4,1 M, Kalijev klorid (KCl) 940 mM, Natrij etilendiamintetraoctena kiselina (Na_2EDTA) 170 mM, Natrijev azid (NaN_3) 380 mM)

Medij za smrzavanje

DMSO 10% (v/v), *Fetal Calf Serum* (FCS) 30% (v/v), RPMI medij 60%

PBS (fiziološka otopina puferirana fosfatnim puferom)

Natrijev klorid (NaCl) 137 mM, Kalijev klorid (KCl) 2,7 mM, Natrijev hidrogenfosfat (Na_2HPO_4) 10 mM, Kalijev dihidrogenfosfat (KH_2PO_4) 2 mM

3.1.3. Laboratorijsko posuđe

6-rupičaste ploče za uzgoj tkiva i adherentnih stanica, TPP, Trasadingen, Švicarska

6-rupičaste ploče za uzgoj neadherentnih stanica, Orange Scientific, Braine l'Alleund, Belgija

Eppendorf-epruvetice za zamrzavanje stanica, Greiner Bio-One, Kremsmünster, Austrija

Petrijeve posude za uzgoj tkiva, Greiner Bio-One, Kremsmünster, Austrija

3.1.4. Protutijela

Anti-mišje CD16/32, štakorčje protutijelo konjugirano fluorescein izocijanatom, BD Biosciences, San Jose, California, SAD

Anti-mišje CD86, štakorčje protutijelo konjugirano fikoeritriinom, BD Biosciences, San Jose, California, SAD

Anti-mišje CD206, štakorčje protutijelo, BioRad, Hercules, California, SAD

Anti-mišji Ig, biotinitirano poliklonalno kozje protutijelo, Dako, Glostrup, Danska

Anti-mišji Ig, kozje protutijelo konjugirano fluorescin izocijanatom, BD Biosciences, San Jose, California, SAD

Anti-mišji IgG_{2b}, štakorčje protutijelo konjugirano fikoeritriinom, BD Biosciences, San Jose, California, SAD

Anti-mišje iNOS, kuničje protutijelo, Abcam, Cambridge, Ujedinjeno Kraljestvo

Anti-štakorčji Ig, kozje protutijelo konjugirano fluorescin izocijanatom, BD Biosciences, San Jose, California, SAD

3.2. METODE

3.2.1. Stanična linija BV-2 mikroglija kao model za istraživanje

Mikroglijalna stanična linija BV-2 je stanična linija koja se najčešće koristi kao zamjena za primarne kulture mikroglija stanica. Dobiva se imortalizacijom mikroglija stanica izoliranih iz novorođenog miša pomoću J2 retrovirusa koji je nosač za onkogen *v-raf/v-myc*. Prethodnim ispitivanjima je potvrđeno da bez obzira na kvantitativne razlike (primjerice u količini lučenja citokina), BV-2 stanična linija na podražaje reagira slično primarnim mikroglija stanicama. Preklapanje u povišenoj ekspresiji gena nakon stimulacije LPS-om kod BV-2 stanične linije i primarnih mikroglija iznosi 90%, stoga ju se može smatrati prikladnom zamjenom za kulturu primarnih mikroglija stanica. Stanice su uzgajane na 37°C i 5% CO₂.

3.2.2. Svjetlosna mikroskopija

Promjene u morfologiji BV-2 mikroglija stanica kultiviranih u mediju DMEM bez i uz dodatak 10% FCS-a praćene su pomoću svjetlosnog mikroskopa Olympus CKX41. Slike su dobivene pomoću programa Image Studio Lite.

3.2.3. Imunofluorescencija na staklu (*in situ*)

Stanice su uzgajane (37°C, 5% CO₂) na 6-rupičastim pločama za uzgoj stanica u koje je prije naseljavanja stavljeno sterilno pokrovno stakalce. Nakon vremena inkubacije 24h i tretiranje s Naltreksonom u rasponu koncentracija 10-50-100-250 µM uklonjen je medij za uzgoj stanica. Stanice su tri puta isprane PBS-om te je dodan 4%-tni paraformaldehid koji omogućava fiksaciju stanica (15 minuta). Nakon svakog koraka stakalce sa stanicama triput je ispirano PBS-om. Nakon fiksacije stanice su tretirane s 0,5%-tnim detergentom Triton-x u svrhu permeabilizacije stanične membrane (7 minuta). Zatim je uslijedilo blokiranje pomoću DMEM-a ili 2%-tnog FCS seruma (30 minuta, 4°C), nakon čega je stanicama dodano 250 µL otopine odgovarajućeg primarnog protutijela koje je inkubirano 1 sat na sobnoj temperaturi. Nakon toga uslijedilo je dodavanje 250 µL otopine odgovarajućeg sekundarnog protutijela konjugiranog s fluorescentnom bojom (45 minuta na sobnoj temperaturi u mraku). Po završetku inkubacije sekundarnog protutijela stakalce s uzorkom je pomoću moviola uklopljeno na predmetno staklo i pohranjeno u mapi tijekom noći. Sljedeći dan je fluorescentnim mikroskopom (Olympus BX51) očitavan signal. Slike su dobivene pomoću programa Olympus Cell-F.

3.2.4. Protočna citometrija (FACS analiza)

Priprema uzoraka

BV-2 stanice pripremljene su u 6-rupičastim plastičnim pločama za uzgoj tkiva (37°C, 5% CO₂). Nakon tretmana i određenog vremena inkubacije stanice su kratkim djelovanjem tripsina odvojene s podloge. Pomoću DMEM medija zaustavljeno je djelovanje tripsina i takva stanična suspenzija je centrifugirana (centrifuga Thermo Scientific, 1500 rpm, 5 minuta na sobnoj temperaturi). Zatim su stanice resuspendirane pomoću 1 mL FACS medija. 100 µL stanične suspenzije s otprilike 10⁵ stanica podijeljeno je na odgovarajući broj epruveta. U svaku epruvetu dodano je 100 µL otopine odgovarajućeg primarnog protutijela koje je inkubirano 1h na 4°C u mraku. Uslijedilo je ispiranje s FACS medijem i centrifugiranje (centrifuga Thermo Scientific, 2000 rpm, 2 minute na sobnoj temperaturi). Ukoliko primarno protutijelo nije bilo izravno konjugirano fluorescentnom bojom, stanicama je dodano 100 µL otopine odgovarajućeg sekundarnog protutijela konjugiranog fluorescentnom bojom. Inkubacija je trajala 45 minuta na 4°C u mraku, nakon čega je protutijelo isprano, a stanice su centrifugirane kako je prethodno opisano. Nakon centrifugiranja na talog je dodano 150 µL FACS medija. Ukoliko analiza nije bila provedena odmah nakon pripreme uzorka, dodano je 150 µL 4%-tnog paraformaldehida za fiksaciju. Takav uzorak može najviše 5 do 7 dana biti pohranjen na 4°C.

Analiza stanica protočnim citometrom

Stanice obilježene fluorescein izocijanatom (FITC) ili fikoeritriinom (PE) analizirane su na FACSCalibur protočnom citometru (Becton-Dickinson). Emisija fluorescentnih boja detektira se pomoću laserske zrake valne duljine od 488 nm. FITC emitira zelenu svjetlost (~520 nm),

dok PE emitira crvenu svjetlost (~575 nm). 5000-10000 stanica analizirano je pomoću programa CellQuest Pro. Rezultati su prikazani kao histogrami koji pokazuju intenzitet fluorescencije, a obrađeni su pomoću programa Winmidi.

3.2.5. Metabolički esej (Seahorse)

Standardne ploče koje su sastavni dio Seahorse kita s kalibracijskom tekućinom (1 ml/rupici) te ploča s injekcijskim ulazima i sondama ostavljene su preko noći u CO₂-free inkubatoru na 37°C. Sljedeći dan, stanice su naseljene na Seahorse ploče s 24 uzorka u gustoći od $0,2 \times 10^6$ stanica/rupici, od čega je jedna rupica u svakom stupcu sadržavala samo medij bez stanica, koji je služio kao negativna kontrola. Stanice su tretirane i stimulirane prema protokolu. Prije analize, sa stanica je uklonjen medij i zamijenjen s XF assay puferom s dodatkom glukoze i piruvatom (500 µl/rupici) te je ploča sa stanicama smještena u CO₂-free inkubator na jedan sat. Inhibitori, oligomicin i karbonil cijanid-p-(trifluorometoksi)fenilhidrazon (FCCP), dodani su u odgovarajući ulazni port na ploči. Ta je ploča, zajedno sa standardnom pločom, kalibrirana na Seahorse analizatoru. Po završetku, standardna ploča je zamijenjena s pločom s uzorcima i analizirana na Seahorse XF-24 analizatoru (Extracellular Flux Analyzer, Agilent, Santa Clara, CA, USA), čime se u konačnici prikazuju rezultati mjerenja mitohondrijske respiracije kroz brzinu potrošnje kisika OCR (oxygen consumption rate) i glikolitičke aktivnosti kroz vanstanični stupanj zakiseljavanja ECAR (extracellular acidification rate).

4. REZULTATI

4.1. Uspostava modela stanične diferencijacije te karakterizacije staničnog fenotipa pod utjecajem naltreksona

BV-2 stanice predstavljaju imortaliziranu mikroglijalnu staničnu liniju kao najčešće korišteni zamjenski model za izučavanje funkcije primarnih mikroglija stanica kao i njihovog odgovora na različite podražaje. Iako *in-vitro* stanični mikrokoliš ne može dati točnu presliku onoga u središnjem živčanom sustavu, primarna kultura mikroglija stanica značajno je prisutna u istraživanjima zbog fenotipske sličnosti sa *in vivo* stanicama⁴¹. Ovaj model nudi visoku reproducibilnost, pristupačnost, jednostavnost korištenja i ne pokazuje odstupanja u staničnim svojstvima poput nekih drugih staničnih linija. U prilog potvrde vjerodostojnosti BV-2 stanične linije kao odgovarajuće i dostatne zamjene primarnih mikroglija stanica, provedeno je nekoliko komparativnih studija staničnih linija od kojih je ona od *Henna i suradnika* potvrdila 90% preklapanje u izražaju gena između BV-2 stanica i primarnih mikroglija stanica nakon stimulacije LPS-om⁴².

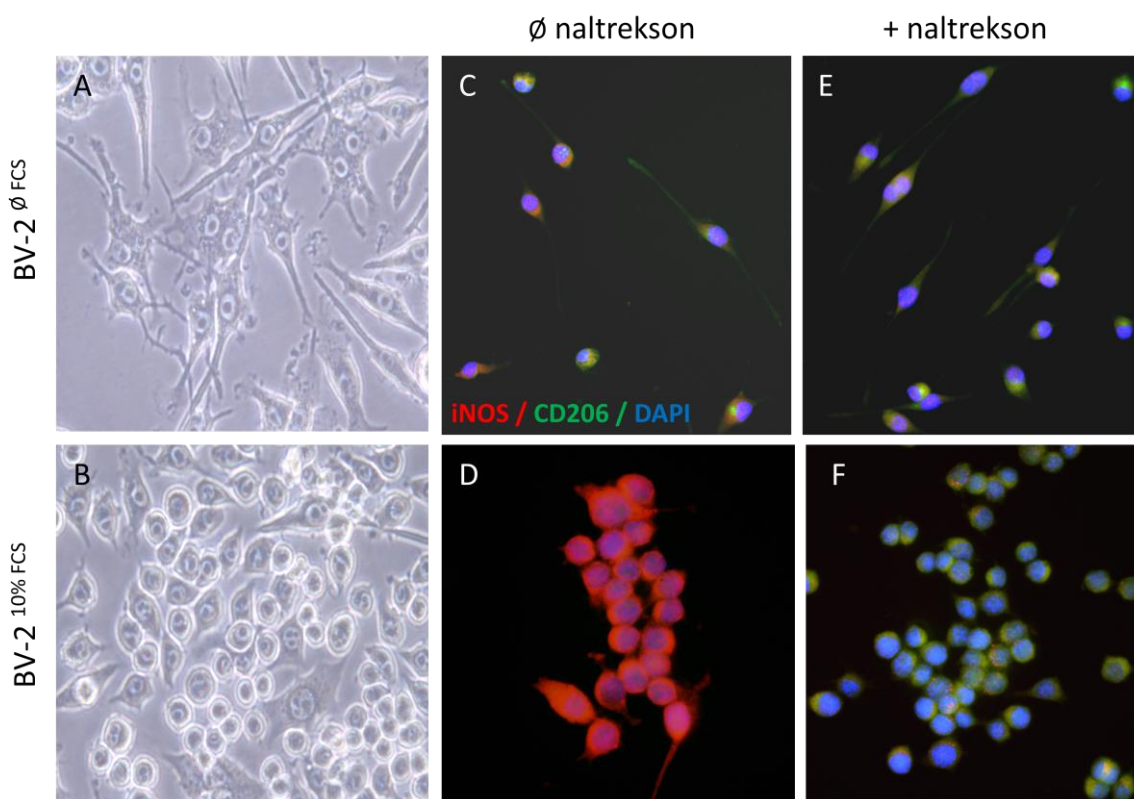
BV-2 mikroglija stanice uobičajeno se uzgajaju u mediju DMEM uz dodatak 10 % v/v seruma (10% FCS). Nakon standardnog uzgoja u 10% DMEM mediju zapažen je pretežito ameboidan oblik (Slika 6B), a takva morfologija prisutna je i nakon kultivacije BV-2 mikroglija stanica u mediju u kojem je prethodno uzgajana primarna kultura mikroglija stanica (nije prikazano). Bilo je potrebno više modificiranja supstrata i medija za indukciju razgranatosti ovih stanica *in vitro* kako bi bile reprezentativne onima *in vivo* i u tu svrhu stanice smo kultivirali u mediju bez dodatka FCS (0% FCS) kako bismo suprimirali njihovo konstitutivno aktivacijsko stanje u uvjetima standardne kultivacije. Oduzimanjem FCS-a iz medija za uzgoj, BV-2 stanice počinju pružati izdanke poprimajući nakon 24-48 h razgranatu (engl. *ramified*) morfologiju (Slika 6A).

Razgranati oblik predstavlja obilježje mirujućih (engl. *resting*) tj. neaktiviranih mikroglija stanica. Njihov umirujući i aktivirajući fenotip potvrdili smo metodom imunofluorescencije na staklu (Slika 6 C/D) i FACS analizom (Slika 7).

Nakon uspješne stanične diferencijacije u karakteristični stanični fenotip temeljen na morfologiji, sljedeći cilj bio je pobliže definirati funkcijski fenotip i smjer polarizacije BV-2 mikroglija stanica temeljen na njihovom aktivacijskom stanju. U tu svrhu korištena je metoda imunofluorescencije na staklu. Izražaj iNOS (engl. *Inducible Nitric Oxide Synthase*), enzima koji proizvodi NO tijekom upale, korišten je kao biljeg M1 aktivacijskog stanja, a molekula CD206, manozni receptor, korištena je kao biljeg M2 aktivacijskog stanja. Rezultati pokazuju da je enzim iNOS i konstitutivno izražen u ameboidnim BV-2 mikroglija stanicama kultiviranih u uvjetima sa 10% FCS-a (Slika 6D) što ukazuje na visoku proizvodnju NO i s njime udruženim M1 aktivirajućim staničnim fenotipom. Oduzimanjem FCS-a opada izražaj iNOS-a (Slika 6C) i proizvodnje NO. Upravo obrnuti obrazac izražaja CD206 molekule kao M2 protuupalnog markera potvrđuje združenost ovog markera sa mirujućim staničnim fenotipom razgranatih BV-2 mikroglija stanica kultiviranih bez dodatka seruma (Slika 6C).

Nadalje, cilj nam je bio u opisanim uvjetima testirati učinak naltreksona koji je potvrđen kao ne-stereoselektivni inhibitor LPS-om inducirane proizvodnje NO u BV-2 stanicama⁴³. U svrhu potvrde njegovog pretpostavljenog protuupalnog svojstva, stanice smo kultivirali s 10% FCS-a inducirajući aktivirani ameboidni fenotip (iNOS^{poz} CD206^{neg}) i na njemu testirali niske efektivne doze naltreksona (NDN) u rasponu koncentracija od 10-50-100-250 µM pri čemu se doza od 100 µM pokazala najučinkovitija (uz očuvanu vijabilnost stanica) u postizanju mirujućeg staničnog fenotipa (iNOS^{neg} CD206^{poz}) sa reciprocitetom izražaja navedenih markera, smanjenjem izražaja iNOS/NO i povećanjem CD206 (Slika 6F). Daleko manje izražen

obrazac promjena zabilježen je u stanicama kultiviranih bez seruma koje već same po sebi u navedenim kultivacijskim uvjetima pokazuju mirujući obrazac u kojem je učinak naltreksona samo dodatnog karaktera (Slika 6C/E).



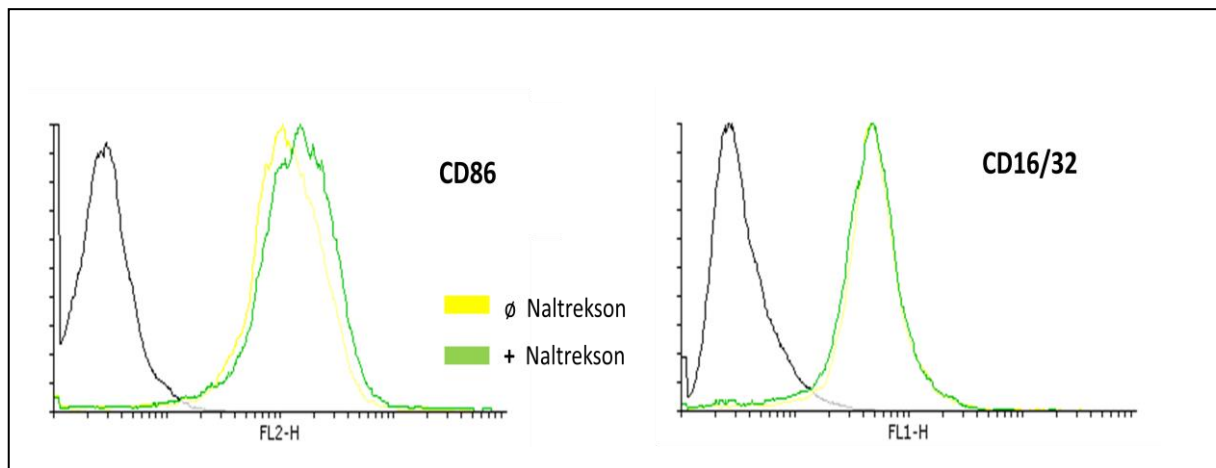
Slika 6: Promjene u morfologiji i M1/M2 aktivacijskom stanju BV-2 mikroglija stanica u različitim uvjetima kultivacije (0-10% FCS) te posljedični učinak naltreksona u oba diferencirana stanična fenotipa. BV-2 mikroglija stanice uzgajane su 24-48 h u različitim uvjetima kultivacije u mediju s 0% FCS-a (*gornji panel*) i uz 10% FCS-a (*donji panel*) te je morfologija stanica prikazana svjetlosnim mikroskopom s faznim kontrastom pri čemu je jasno vidljiv različit morfološki fenotip (razgranati, A i ameboidni, B). Imunofluorescencija na staklu je provedena u svrhu praćenja M1 citoplazmatskog biljega iNOS-a (primarno protutijelo anti-iNOS uz sekundarno anti-kuniće IgG-Alexa 555, *crvena fluorescencija*) M2 biljega CD206 (anti-CD206, uz sekundarno protutijelo anti-štakorje IgG-Alexa 488, *zeleni fluorescencija*) te je stanična jezgra prikazana bojom DAPI (*plava fluorescencija*). Povećanje iznosi 40x.

4.2. Imunomodulacijska svojstva naltreksona

Pored spomenutih biljega M1 (iNOS) i M2 (CD206) aktivacijskog stanja mikroglija stanica prikazanih metodom imunofluorescencije na staklu, izražaj površinskih staničnih proteina CD86 i CD16/32 analizirali smo pomoću metode protočne citometrije. CD86 (B7-2) molekula povezuje se s M1 aktivacijskim stanjem perifernih makrofaga i mikroglija stanica i u okolnostima preuzimanja antigen prezentirajuće uloge ove stanice u povećanoj mjeri izražavaju CD86 molekulu koja stupa u interakciju s CD28 molekulom na limfocitima T što predstavlja kostimulacijski signal nužan za aktivaciju T stanica⁴⁴. Nadalje, CD16/32 molekula predstavlja vrstu Fc-receptora koji vezuje Fc fragment protutijela razreda IgG u cilju poticanja citotoksičnog tj. fagocitoznog odgovora imunoloških stanica⁴⁵. CD86 i CD16/32 koristili smo u našem modelu kao dodatne biljege M1 aktivacijskog stanja i utvrdili povećanu razinu njihovog izražaja na površini BV-2 stanica u uvjetima kultivacije sa dodatkom seruma što je potvrdilo stanje njihove konstitutivne aktivacije već ranije definirane BV-2^{10% FCS} staničnim fenotipom u odnosu na BV-2^{0FCS} fenotip koji je bio popraćen niskim izražajem CD86 (nije prikazano). Populaciju stanica s fenotipom BV-2^{10%FCS} pridružili smo dodatne fenotipske oznake CD86⁺CD16/32⁺ i koristili kao kontrolu za testiranje učinka naltreksona na površinski stanični izražaj navedenih molekula značajnih u modulaciji imunološkog odgovora.

Dodavanjem naltreksona izražaj ovih molekula nije se značajnije mijenjao (Slika 7) što upućuje na slabo imunomodulacijsko svojstvo naltreksona spregnuto sa zbivanjima na staničnoj površini. Imajući u vidu podatak Wang i sur. o karakteristikama ovih stanica vezanih u njihovo konstitutivno slabije svojstvo oslobađanja citokina u omjeru na unutarstanični sadržaj istog⁴³, skloni smo pripisati ovim stanicama i moguću slabiju dinamiku

zbivanja na staničnoj membrani uslijed čega i rezultat analize površinskih zbivanja valja oprezno tumačiti (slični rezultati dobiveni su s MHC molekulama I i II razreda, nije prikazano).



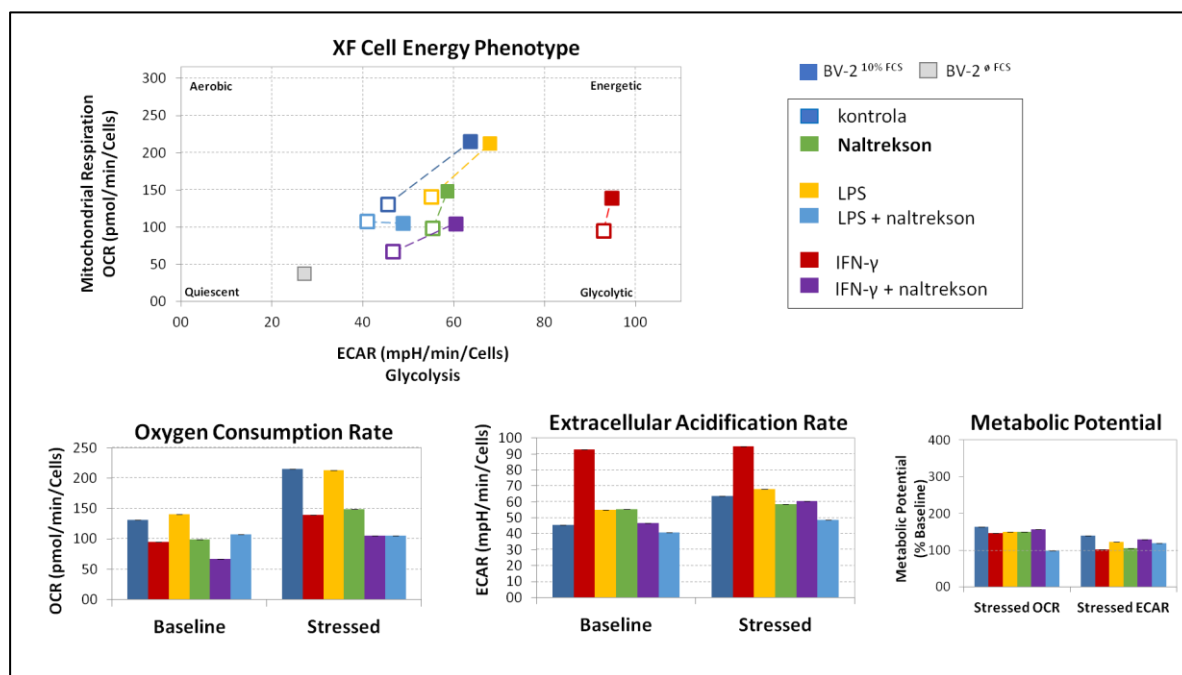
Slika 7. Izražaj površinskih molekula BV-2^{10%FCS} mikroglia stanica tretiranih naltreksonom.

BV-2 mikroglialna stanična linija uzgajana je 24 h u mediju s dodatkom 10% FCS-a. Stanicama je potom dodan naltrekson u dozi od 100 μ M i nakon 24h pripremljeni su uzorci i površinski izražaj CD86 i CD16/32 molekula analiziran je FACS –om / protočnom citometrijom i prikazan histogramskim krivuljama. Korištena protutijela za vizualizaciju CD molekula su anti-CD86-PE (FL2 fluorescencija) i anti-CD16/32-FITC (FL1 fluorescencija), a sekundarna anti-štakorje IgG2b-PE i anti-štakorje Ig-FITC predstavljaju negativne kontrole (crna linija histograma).

4.3. Metabolički učinak naltreksona

Pored navedenog M1/M2 polarizacijski profil vezuje se istodobno i uz energijski i metabolički status stanice pri čemu postoje brojni induktori metaboličkog reprogramiranja koji stanicu konfiguriraju u odgovarajući metabolički fenotip. Prema navedenom konceptu, M1 stanje udruženo je s povećanom glikolitičkom aktivnošću stanice, dok je M2 praćeno povećanom oksidativnom fosforilacijom kao parametra mitohondrijske respiracije⁴⁶. Za induktore aktivacije BV-2 stanice koristili smo suplementaciju s FCS-om (PI3/Akt/mTOR), LPS (TLR4/mTOR) i IFN- γ (JAK/STAT), a stanični metabolizam u navedenim uvjetima aktivacije

pratili smo Seahorse metodom. Rezultati dobiveni ovom metodom pokazuju BV-2^{10%FCS} stanice metabolički aktivne (visoka glikolitička aktivnost mjerena povećanjem vanstanične kiselosti) u aerobnom respiracijskom statusu (mitohondrijska respiracija mjerena kroz utrošak kisika) (Slika 8). Za razliku od njih BV-2^{Ø FCS} stanice su mirujuće i energijski neaktivne. LPS inducira povećanje aerobnog metabolizma dok IFN- γ inducira porast anaerobnog metabolizma. Naltrekson s jedne strane smanjuje aerobni metabolizam smanjujući energetske aktivnosti stanice inducirane s LPS-om. S druge strane naltrekson izrazito smanjuje anaerobni metabolizam u stanicama aktiviranih s IFN- γ . Ovime se naltrekson potvrđuje kao lijek koji djeluje na uspostavi ravnoteže staničnog metabolizma vodeći hiperaktivirane stanice u hipoenergetsko stanje.



Slika 8: Naltrekson smanjuje aktivaciju BV-2 mikroglija stanica

Stanice su tretirane sa 100 ng/ml LPS i 10 ng/ml IFN- γ 24h i nakon tretiranja stanica naltreksonom u koncentraciji od 100 μ M uzorci su analizirani s XF Cell Energy Phenotype kitom na Seahorse uređaju.

5. RASPRAVA

Dosadašnje spoznaje svrstavaju naltrekson među neselektivne antagoniste opioidnih receptora, no otkrivanjem njegovog antagonističkog učinka na ne-opioidne receptore poput TLR-4, izraženog na imunološkim stanicama tipa makrofaga i mikroglije, proširuje se mogućnost njegove primjene kao svojevrsnog imunomodulatora.

Slijedeći koncept korištenja niskih doza naltreksona (NDN) kao protuupalnog lijeka koji modulira aktivnost glija stanica⁵, postavili smo stanični model koristeći BV-2 staničnu liniju mikroglije za testiranje njegovog spomenutog svojstva.

Stanični modeli pokazali su se tijekom zadnjih desetljeća kao relevantni fiziološki modeli u testiranju lijekova.

Unatoč nedostacima, primarna kultura mikroglija stanica koristi se u istraživanjima zbog fenotipske sličnosti s *in vivo* stanicama⁴¹, dok BV-2 imortalizirana stanična linija predstavlja najčešće korišteni zamjenski model.

BV-2 stanična linija izražava značajke aktiviranih mikroglija⁴⁷, ali dijeli i karakteristike aktiviranih makrofaga na što upućuje njihova konstitutivna ameboidna morfologija.

Iz literature je poznato da se optimalni uvjeti uzgoja primarne kulture mikroglija stanica postižu dodatkom 5% fetalnog goveđeg seruma (FCS) jer se na taj način osigurava adherencija i sferoidna morfologija s pojavom kratkih izdanaka nakon 24-72 sata kultivacije. Veći udio FCS-a (>10%) rezultira pojavom malog, zaokruženog monocitnog fenotipa i smanjenom adherencijom, što dovodi do podizanja stanica s podloge. Stoga je bilo potrebno višestruko modificirati supstrate i medij za indukciju razgranatosti ovih stanica *in vitro* kako bi zadobile odgovarajući razgranati fenotip u kakvom obitavaju u *in vivo* uvjetima kao rezidentne stanice SŽS-a.

Koristeći ova saznanja pretpostavili smo da su BV-2 stanice kultivirane u navedenim uvjetima uz dodatak 10% FCS-a (BV-2^{10% FCS}) na određeni način konstitutivno aktivirane u M1 aktivacijskom stanju. Navedene promjene u morfološkim i funkcijskim karakteristikama BV-2 mikroglija stanica vjerojatno su potaknute faktorom/ima u serumu. Moguće je da takav utjecaj ostvaruje Fetuin A, serumski protein koji je uz albumin jedna je od najvećih komponenata fetalnog seruma, a od nedavno je uvršten na listu DAMP signala²⁹. Serumom inducirani aktivirani fenotip popraćen je visokim izražajem M1 aktivacijskog markera iNOS (Slika 6D) i pridružen morfološkim karakteristikama ameboidnosti potvrđenim za aktivirano stanje mikroglije (Slika 6B). Aktivirani ameboidni fenotip naznačili smo kao iNOS^{poz} CD206^{neg} i koristili kao polazišnu platformu za testiranje protuupalnog svojstva naltreksona. Postizanje mirujućeg staničnog fenotipa iNOS^{neg}CD206^{poz} istovjetnog s BV-2^{0FCS} s reciprocitetom izražaja navedenih markera, smanjenjem iNOS/NO (M1 aktivacijskog markera) i povećanjem CD206 (M2 aktivacijskog markera) smatrali smo dokazom ispitivanog svojstva ovog lijeka (Slika 6F). Sljedeći cilj bio je pobliže definirati funkcijski fenotip i smjer polarizacije BV-2 mikroglija stanica temeljen na njihovom aktivacijskom stanju. Budući da mikroglija u SŽS ima imunološku funkciju, imunomodulacijski učinak naltreksona istražili smo analizom izražaja molekula značajnih u modulaciji imunološkog odgovora. Naltrekson nije mijenjao imunološki aktivacijski fenotip CD86⁺CD16/32⁺ (Slika 7), zbog čega smo mu pripisali slaba imunomodulacijska svojstva, no potrebna su dodatna testiranja kako bismo odredili selektivnost djelovanja unutar zbivanja na staničnoj membrani. Naslanjajući se na koncept pri kojem se morfologija mikroglije dovodi u pozitivnu korelaciju s njenim funkcijskim značajkama, valja biti oprezan s interpretacijom ovih rezultata, posebno imajući u vidu podatak Wanga i sur.⁴³ kako karakteristike zbivanja na staničnoj membrani ne prate dinamiku onih iz primarnih uvjeta.

Pored navedenog, polarizacijski M1/M2 profil veže se istodobno i uz energetski i metabolički status stanice pa smo za induktore metaboličkog reprogramiranja koristili LPS i IFN- γ koji su stanicu konfigurirali u odgovarajući inducirani aktivacijski metabolički fenotip.

Naltrekson je bio jednako učinkovit u metabolički aktivnim stanicama čija je aktivnost inducirana s FCS-om, LPS-om te IFN- γ vrativši ih u bazične uvjete energoze (Slika 8). Nadalje, s obzirom na jaču komponentu djelovanja u smanjivanju aerobnog metabolizma u odnosu na anaerobni, proizlazi potreba dodatnog ispitivanja naltreksona kao modulatora mitohondrijske respiracije. Njegov navedeni potencijal da metabolički prilagođava stanicu prema zahtjevima i potrebama miljea koordinirajući njen odgovor u pravcu bioenergetičke spremnosti, naltrekson se može promatrati u kontekstu modulatora imuno-metabolomike.

6. ZAKLJUČCI

- Naltrekson u koncentraciji od 100 μM dovodi do pretvorbe staničnog fenotipa BV-2 mikroglija stanica iz aktiviranog (iNOS^{poz} $\text{CD206}^{\text{neg}}$) u mirujuć (iNOS^{neg} $\text{CD206}^{\text{poz}}$) fenotip.
- Naltrekson ne pokazuje imunomodulacijski učinak na aktivirane BV-2 mikroglija stanice budući da ne mijenja izražaj površinskih staničnih molekula (CD86, CD16/32, CD206, MHC molekula I i II razreda).
- Naltrekson uspostavlja ravnotežu staničnog metabolizma dovodeći BV-2 mikroglija stanice iz hiperaktiviranog (inducirane s FCS, LPS, IFN- γ) u hipoenergetsko stanje.
- Protuupalno svojstvo niske doze naltreksona karakterizirano je kroz modulaciju aktivnosti mikroglija stanica, što ukazuje na opravdanost njegove primjene u upalnim stanjima SŽS.

7. LITERATURA

1. Resnick RB, Volavka J, Freedman AM, Thomas M. Studies of EN-1639A (naltrexone): a new narcotic antagonist. *Am J Psychiatry*. 1974;131(6):646-50.
2. Verebey K, Mule SJ. Naltrexone pharmacology, pharmacokinetics, and metabolism: current status. *Am J Drug Alcohol Ab*. 1975;2(3-4):357-63.
3. Agencija za lijekove i medicinske proizvode: <http://www.halmed.hr/Lijekovi/Baza-lijekova/>. Datum pristupa: 31.08.2018.
4. Brunton LL, Knollmann BC, Hilal-Dandan R. Goodman & Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics. 13th ed.; Mc Graw Hill; 2018. str: 356-86.
5. Younger J, Parkitny L, McLain D. The use of low-dose naltrexone (LDN) as a novel anti-inflammatory treatment for chronic pain. *Clin Rheumatol* 2014;33(4):451-9.
6. Smith JP, Bingaman SI, Ruggiero F, Mauger DT, Mukherjee A, McGovern CO, et al. Therapy with the opioid antagonist naltrexone promotes mucosal healing in active Crohn's disease: a randomized placebo-controlled trial. *Dig Dis Sci* 2011;56(7):2088-97.
7. Cree BA, Kornyejeva E, Goodin DS. Pilot trial of low-dose naltrexone and quality of life in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2010;68(2):145-50.
8. Younger J, Noor N, McCue R, Mackey S. Low-dose naltrexone for the treatment of fibromyalgia: findings of a small, randomized, double-blind, placebo-controlled, counterbalanced, crossover trial assessing daily pain levels. *Arthritis Rheum* 2013;65(2):529-38.
9. Watkins LR, Hutchinson MR, Ledebor A, Wieseler-Frank J, Milligan ED, Maier SF. Glia as the "bad guys": Implications for improving clinical pain control and the clinical utility of opioids. *Brain Behav Immun* 2007;21(2):131-46.
10. Saijo K, Crotti A, Glass CK. Regulation of microglia activation and deactivation by nuclear receptors. *Glia* 2013;61(1):104-11.
11. Nicotra L, Loram LC, Watkins LR, Hutchinson MR. Toll-like receptors in chronic pain. *Exp Neurol* 2012;234(2):316-29.
12. Grace PM, Hutchinson MR, Maier SF, Watkins LR. Pathological pain and the neuroimmune interface. *Nature Rev Immunol* 2014;14(4):217-31.

13. Wieseler-Frank J, Maier SF, Watkins LR. Immune-to-brain communication dynamically modulates pain: physiological and pathological consequences. *Brain Behav Immun* 2005;19(2):104-11.
14. Kettenmann H, Hanisch UK, Noda M, Verkhratsky A. Physiology of microglia. *Physiol Rev* 2011;91(2):461-553.
15. Saijo K, Glass CK. Microglial cell origin and phenotypes in health and disease. *Nature reviews Immunology* 2011;11(11):775-87.
16. Dheen ST, Kaur C, Ling EA. Microglial activation and its implications in the brain diseases. *Curr Med Chem* 2007;14(11):1189-97.
17. Racki V, Petric D, Kucic N, Grzeta N, Jurdana K, Roncevic-Grzeta I. Cortical gray matter loss in schizophrenia: Could microglia be the culprit? *Med Hypotheses* 2016;88:18-21.
18. Patel AR, Ritzel R, McCullough LD, Liu F. Microglia and ischemic stroke: a double-edged sword. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol* 2013;5(2):73-90.
19. Rio-Hortega P. THE MICROGLIA. *Lancet*. 1939;233(6036):1023-1026.
20. Giulian D, Baker TJ. Characterization of ameboid microglia isolated from developing mammalian brain. *J Neurosci* 1986;6(8):2163-78.
21. Harry GJ. Microglia during development and aging. *Pharmacol Therap* 2013;139(3):313-26.
22. Guillemin GJ, Brew BJ. Microglia, macrophages, perivascular macrophages, and pericytes: a review of function and identification. *J Leukoc Biol* 2004;75(3):388-97.
23. Kettenmann H, Kirchhoff F, Verkhratsky A. Microglia: new roles for the synaptic stripper. *Neuron* 2013;77(1):10-8.
24. Brown GC, Neher JJ. Microglial phagocytosis of live neurons. *Nat Rev Neurosci* 2014;15(4):209-16.
25. Tremblay ME, Stevens B, Sierra A, Wake H, Bessis A, Nimmerjahn A. The role of microglia in the healthy brain. *J Neurosci* 2011;31(45):16064-9.
26. Barger SW, Harmon AD. Microglial activation by Alzheimer amyloid precursor protein and modulation by apolipoprotein E. *Nature* 1997;388(6645):878-81.
27. Chen GY, Nunez G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nature reviews Immunology* 2010;10(12):826-37.

28. Stewart CR, Stuart LM, Wilkinson K, van Gils JM, Deng J, Halle A, et al. CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a Toll-like receptor 4 and 6 heterodimer. *Nat Immunol* 2010;11(2):155-61.
29. Pal D, Dasgupta S, Kundu R, Maitra S, Das G, Mukhopadhyay S, et al. Fetuin-A acts as an endogenous ligand of TLR4 to promote lipid-induced insulin resistance. *Nat Med* 2012;18(8):1279-85.
30. Heneka MT, Rodriguez JJ, Verkhratsky A. Neuroglia in neurodegeneration. *Brain Res Rev* 2010;63(1-2):189-211.
31. Beumer W, Gibney SM, Drexhage RC, Pont-Lezica L, Doorduyn J, Klein HC, et al. The immune theory of psychiatric diseases: a key role for activated microglia and circulating monocytes. *J Leukoc Biol* 2012;92(5):959-75.
32. Biber K, Owens T, Boddeke E. What is microglia neurotoxicity (Not)? *Glia* 2014;62(6):841-54.
33. Hanisch UK. Functional diversity of microglia - how heterogeneous are they to begin with? *Front Cell Neurosci* 2013;7:65.
34. Block ML, Zecca L, Hong JS. Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nat Rev Neurosci* 2007;8(1):57-69.
35. Tang Y, Le W. Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Mol Neurobiol* 2016;53(2):1181-94.
36. Selenica ML, Alvarez JA, Nash KR, Lee DC, Cao C, Lin X, et al. Diverse activation of microglia by chemokine (C-C motif) ligand 2 overexpression in brain. *J Neuroinflamm* 2013;10:86.
37. Ledebroer A, Breve JJ, Poole S, Tilders FJ, Van Dam AM. Interleukin-10, interleukin-4, and transforming growth factor-beta differentially regulate lipopolysaccharide-induced production of pro-inflammatory cytokines and nitric oxide in co-cultures of rat astroglial and microglial cells. *Glia* 2000;30(2):134-42.
38. Butovsky O, Talpalar AE, Ben-Yaakov K, Schwartz M. Activation of microglia by aggregated beta-amyloid or lipopolysaccharide impairs MHC-II expression and renders them cytotoxic whereas IFN-gamma and IL-4 render them protective. *Mol Cell Neurosci* 2005;29(3):381-93.
39. Mills CD. M1 and M2 Macrophages: Oracles of Health and Disease. *Crit Rev Immunol* 2012;32(6):463-88.

40. Nakagawa Y, Chiba K. Role of microglial m1/m2 polarization in relapse and remission of psychiatric disorders and diseases. *Pharmaceuticals* 2014;7(12):1028-48.
41. Stansley B., Post J., Hensley K. A comparative review of cell culture systems for the study of microglial biology in Alzheimer's disease. *J Neuroinflamm* 2012;9(1):1-8.
42. Henn A., Lund S., Hedtjörn M., Schrattenholz A., Pörzgen P., Leist M. The suitability of BV2 cells as alternative model system for primary microglia cultures or for animal experiments examining brain inflammation. *ALTEX* 2009;26(2):83–94.
43. Wang X., Zhang Y., Peng Y., Hutchinson MR., Rice KC., Yin H., Watkins LR. Pharmacological characterization of the opioid inactive isomers (+)-naltrexone and (+)-naloxone as antagonists of toll-like receptor 4. *Brit J Pharmacol* 2016;173(5):856-869
44. Harris N.L., Ronchese F. The role of B7 costimulation in T-cell immunity. *Immunol Cell Biol* 1999;77(4):304–11.
45. Swanson J.A. The coordination of signaling during Fc receptor-mediated phagocytosis. *J Leukoc Biol* 2004;76(6):1093–103.
46. Beth Kelly, Luke AJ O'Neill Metabolic reprogramming in macrophages and dendritic cells in innate immunity. *Cell Res* 2015;25:771-784.
47. Bocchini V., Mazzolla R., Barluzzi R., Blasi E., Sick P., Kettenmann H. An immortalized cell line expresses properties of activated microglial cells. *J Neurosci Res* 1992;31(4):616–21.
48. Sigma-Aldrich: www.sigmaaldrich.com/catalog/search?term=Naltrexone+hydrochloride&interface=ProductName&N=0&mode=modematchpartialmax&lang=en®ion=HR&focus=productN=0220003048219853286219853141. Datum pristupa: 25.08.2018.
49. Ransohoff RM., Brown MA. Innate immunity in the central nervous system. *J Clin Invest* 2012 Apr 2; 122(4): 1164–1171.
50. Huang Y., Feng Z. The good and bad of microglia/macrophages: new hope in stroke therapeutics. *Acta Pharm Sin* 2013; 34(1): 6–7.